

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-276783

(43)Date of publication of application : 20.10.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12N 1/21
 C12N 9/14
 //(C12N 15/09
 C12R 1:92)
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12N 9/14
 C12R 1:19)

(21)Application number : 09-090706

(71)Applicant : EISAI CO LTD

(22)Date of filing : 09.04.1997

(72)Inventor : TAKAI YOSHIMI

(54) PROTEIN FOR ACCELERATING HYDROLYSIS OF GTP

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new protein having an activity for accelerating the hydrolysis of GTP bound to a lipid-modified Rab3 subfamily member, and useful for clarifying mechanisms for releasing neurotransmitters and controlling the secretion of hormones and for clarifying relations with diseases.

SOLUTION: This protein comprises a protein having an amino acid sequence of the formula or the amino acid sequence of the formula wherein one to several amino acids are replaced, deleted or added, and having an activity for specifically stimulating the hydrolysis of GTP bound to Rab3 subfamily member modified with a lipid. The protein is useful for clarifying mechanisms for controlling the release of neurotransmitters and the secretion of hormones and for clarifying the relations with diseases, etc., as a control factor specifically acting on the Rab3 subfamily member related to vesicle transport in cells. The protein is obtained by purifying a synaptic soluble fraction from a rat brain by column chromatography.

```

Met Ala Arg Asp Ser Glu Pro Gln Ser Cys Val Asn Glu Ile Val Asn
1      5      10      15      20      25      30      35      40
Asn Thr Thr Ala Ser Glu Tyr Cys Arg Val Ile Ser Asp Val Glu Glu
45      50      55      60      65      70      75      80      85
Val Leu Asp Asn Tyr Lys Leu Cys Gly Asn Ser Ser Gly Lys Thr Leu
90      95      100      105      110      115      120      125      130
Val Thr Asp Phe Ala Phe Thr Ser Lys Ala Leu Phe Ile Asp Thr Tyr
135      140      145      150      155      160      165      170      175
Ser Val Leu Thr Lys Cys Asn Phe Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Ser
180      185      190      195      200      205      210      215      220
Asn Thr Ser Phe Tyr
225

```

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.04.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-276783

(43) 公開日 平成10年(1998)10月20日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

1/21

1/21

9/14

9/14

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:92)

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-90706

(22) 出願日

平成 9 年 (1997) 4 月 9 日

(71) 出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 10 号

(72) 発明者 高井 義美

兵庫県神戸市西区学園東町 2 - 5 - 73

(74) 代理人 弁理士 清水 初志

(54) 【発明の名称】 G T P 加水分解促進タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 Rab3サブファミリーに特異的な制御因子を単離することを課題とする。

【解決手段】 基質として脂質修飾されたRab3Aを用いた連続的なカラムクロマトグラフィーによりラットの脳のシナプス可溶性分画からGAPを精製し単離することに成功した。さらに、単離したGAPの配列を基に作製したプローブを用いて、該GAPをコードするヒトcDNAを単離することに成功した。単離したGAPについてその機能を解析したところ、該タンパク質が、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有することを見いだした。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 哺乳類由来である請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 配列番号：1に記載のタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質。

【請求項4】 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質。

【請求項5】 請求項1～4に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 請求項5に記載のDNAを含むベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】 請求項7に記載の形質転換体により產生される組み換えタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞内小胞輸送に関与するRab3サブファミリーメンバーに特異的に作用する制御因子、該因子をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体により產生される組み換えタンパク質に関する。

【0002】

【従来の技術】 Rab (Ras-like proteins in rat brain) スモールGタンパク質ファミリーは哺乳動物において約30種及び酵母において約10種のメンバーからなり、ドナー膜からの小胞の出芽、小胞のアクセプター膜との結合及び融合を含む細胞内小胞輸送に関係している (Takai, Y., et al. (1992) *Int. Rev. Cytol.* 133, 187-230, Takai, Y., et al. (1993) *Ciba Foundation Symposium on the GTPase superfamily* 128-146, Simons, K. and Zerial, M. (1993) *Neuron* 11, 789-799, Novick, P. and Breenwald, P. (1993) *Cell* 75, 597-601, Nuoffer, C. and Balch, W. E. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 949-990, Pfeffer, S. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 522-526, Takai, Y., et al. (1996) *Genes To Cells* 1, 615-632)。いくつかのRabファミリーメンバーは高相同性膜をもつサブファミリーを構成している。RabファミリーメンバーはGDP結合非活性形態及びGTP結合活性形態の2つの形態間を循環し、これに応じて細胞質ゾル及び膜部位間を循環する。これら循環する2つの型は小胞輸送におけるこれらのメンバーの作用に必須である (Takai, Y., et al. (1992)

Int. Rev. Cytol. 133, 187-230, Takai, Y., et al. (1993) *Ciba Foundation Symposium on the GTPase superfamily* 128-146, Simons, K. and Zerial, M. (1993) *Neuron* 11, 789-799, Novick, P. and Breenwald, P. (1993) *Cell* 75, 597-601, Nuoffer, C. and Balch, W. E. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 949-990, Pfeffer, S. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 522-526, Takai, Y., et al. (1996) *Genes To Cells* 1, 615-632)。非活性なGDP結合形態は「Rab GDI」と結合して、細胞質ゾル中に存在する。この形態は「Rab GEP」の作用により活性なGTP-結合形態へと変化する。小胞の出芽過程においては、GTP結合活性形態はドナー膜と相互に作用し小胞の出芽を引き起こす。出芽の前、途中、または後に、GTP結合形態は「Rab GAP」の作用によりGDP結合非活性形態へ変化する。小胞がアクセプター膜に結合する過程においては、GTP結合活性形態は小胞と相互に作用し、小胞をアクセプター膜へと転移させる。小胞のアクセプター膜への融合の前、途中、または後に、GTP結合活性形態は「Rab GAP」の作用によりGDP結合非活性形態へ変化する。RabはGDP結合非活性形態に変化すると、再び「Rab GDI」と結合し、細胞質ゾルへと戻る。

【0003】 Rabファミリーメンバーに対するこれら3つのタイプの制御因子の中で、「RabGDI」は実験が行われたすべてのRabファミリーメンバーに作用することが知られている (Sasaki, T., et al. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 2909-2912, Garrett, M. D., et al. (1993) *FEBS Lett.* 331, 233-238, Soldati, T., et al. (1993) *Mol. Biol. Cell* 4, 425-434, Ullrich, O., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18143-18150, Beranger, F., et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13637-13643)。一方、「GAP」に関しては、酵母のRabファミリーメンバーのうち、「Ypt1」および「Sec4」には作用せず、「Ypt6」及び「Ypt7」に作用する1つのGAPが単離されている (Storm, M., et al. (1993) *Nature* 361, 736-739)。しかし、RabファミリーメンバーまたはRabサブファミリーに特異的なGAPは哺乳動物において同定されていない。また、「GEP」に関しても、RabファミリーメンバーまたはRabサブファミリーに特異的なGEPは酵母及び哺乳動物において同定されていない。

【0004】 ところで、Rabサブファミリーのうち、Rab3サブファミリーは、「Rab3A」、「Rab3B」、「Rab3C」、及び「Rab3D」の4のメンバーから構成されている (Pfeffer, S. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 522-526)。これらのメンバーの中で、「Rab3A」及び「Rab3C」はCa²⁺依存性エキソサイトーシスに関係し、特に神経末端からの神経伝達物質放出という脊椎動物にとって極めて重要な機能に関係している。一方、「Rab3B」は下垂体細胞でCa²⁺依存性エンドサイトーシスに関与し、「Rab3D」は脂肪細胞でインスリン依存性のグルコーストランスポーターの輸送に関与していることが示唆されている。従って、Rab3サブファミリーに特異的な制御因子が単離され

3

れば、神経伝達物質の放出やホルモン分泌の制御機構の解明やその異常による疾患の病態の解明や治療法の開発などに利用でき産業上非常に有用である。Rab3サブファミリーのうち、Rab3Aに作用する「GEP」及び「GAP」はラット脳から部分的には精製されているが(Burstein, E. S., et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 2689-2692, Burstein, E. S., and Macara, I. G. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 1154-1158)、これら分子の一次構造及び正確な特性(例えば、Rab3Aに対する特異性など)については明らかになっていない。即ち、Rab3サブファミリーに特異的な制御因子についてはほとんど解明されていないのが現状である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、Rab3サブファミリーに特異的な制御因子を単離することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、基質として脂質修飾されたRab3Aを用いた連続的なカラムクロマトグラフィーによりラットの脳のシナプス可溶性分画からGAPを精製し単離することに成功した。さらに、本発明者らは、単離したGAPの配列を基に作製したプローブを用いて、該GAPをコードするヒトcDNAを単離することに成功した。本発明者らは、単離したGAPについてその機能を解析したところ、該タンパク質が、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有することを見いだした。

【0007】即ち、本発明はRab3サブファミリーメンバーに特異的な制御因子に関し、より具体的には、(1)

脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質、(2) 哺乳類由来である(1)に記載のタンパク質、(3) 配列番号：1に記載のタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質、(4) 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質、(5) (1)～(4)に記載のタンパク質をコードするDNA、(6) (5)に記載のDNAを含むベクター、(7) (6)に記載のベクターを保持する形質転換体、(8) (7)に記載の形質転換体により産生される組み換えタンパク質、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異

4

的に促進する活性を有するタンパク質に関する。

【0009】本発明のタンパク質に含まれる配列番号：1に記載のタンパク質は、基質として脂質修飾されたRab3Aを用いた連続的なカラムクロマトグラフィーによりラットの脳のシナプス可溶性分画から精製されたタンパク質である。該タンパク質は、Rab3サブファミリーメンバー(Rab3A, Rab3B, Rab3C, Rab3D)に特異的に作用する。また、脂質修飾を受けたRab3にのみ作用し、脂質修飾を受けないRab3には作用しない。これらの事実から配列番号：1に記載のタンパク質は、例えば、神経細胞では神経伝達物質の放出に関与した活性型Rab3サブファミリーメンバーに作用して、該メンバーを不活性型に変化させ、神経伝達物質の放出を阻害するなどの機能を有していると考えられる。

【0010】なお、当業者にとっては、周知技術である部位特異的変異誘発法(Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)などを用いて、配列番号：1に記載のタンパク質中のアミノ酸を適宜置換などすることにより配列番号：1に記載のタンパク質の機能的同等物を得ることは常套手段である。従って、配列番号：1に記載のタンパク質中のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0011】また、当業者にとっては、周知技術であるハイブリダイゼーション技術(Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を用いて、配列番号：2に記載のDNA配列(またはその一部)を基に、これと相溶性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質の機能的同等物を得ることも常套手段である。従って、配列番号：2に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質も本発明の範囲に含まれる。ハイブリダイズ技術により得られたタンパク質は、本発明のタンパク質とアミノ酸配列において70%以上の相溶性を有することが好ましく、80%以上の相溶性を有することがさらに好ましく、90%以上の相溶性を有することがさらに好ましい。

【0012】なお、本発明において、「脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性」とは、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を促進し、脂質修飾されていないRab3サブファミリーメンバーに結合したGTP、およびRab3以外のサブファミリーメン

バーに結合したGTPの加水分解を実質的に促進しない活性を指す。脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性は、後述するRab3GAPの標準的測定、overlay法などの方法で検出することが可能である。

【0013】本発明のタンパク質は、後述するカラムクロマトグラフィーなどにより調製できる。また、本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として調製することも可能である。組み換えタンパク質は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2に記載のDNA）を適当なベクターに組み込んで宿主細胞に導入し、得られた形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。

【0014】また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAの形態には、特に制限はない。mRNAから合成されたcDNA、ゲノムDNAの他、化学合成DNAなども本発明のDNAに含まれる。

【0015】本発明のDNAは常法（例えば、cDNAであれば、逆転写酵素等を用いてmRNAから合成後、アルカリSDS法および塩化セシウム密度勾配遠心法などにより調製する）により調製することが可能である。

【0016】また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のDNAが挿入されるベクターとしては特に制限はなく、例えば、クローニング用ベクターであれば、「pBlueScript」、「pGEM」などが挙げられ、また哺乳動物細胞発現用ベクターであれば、「pEF-BOS」、「pSR α 」、「pCMV」などが挙げられる。

【0017】本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌用であれば、「pGEXZT」、「pRSET」、「pT_vCHis」などが挙げられ、SF9細胞用であれば、「pACYM1」などが挙げられ、哺乳動物細胞用では、「pEF-Bos」、「pSR α 」、「pCMV」、「pBlueScript」等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0018】ベクターへの本発明のDNAの挿入は、例えば、文献（Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY）に記載の方法により行うことができる。

【0019】また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては、本発明のベクターに適合する細胞であれば特に制限はなく、種々の動物細胞（例えば、天然の細胞の他、COS細胞、PC12細胞などの株化された細胞など）、細菌、酵母、昆虫細胞などが挙げられる。本発明のタンパク質の製造目的であれば、特に、大腸菌、SF9細胞などが好適である。

【0020】宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、文献（Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (198

9) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY）記載の方法に従って行うことが可能である。

【0021】形質転換体内で発現した本発明の組み換えタンパク質は、種々のクロマトグラフィー、電気泳動法、ゲル濾過などの常法を適宜組み合わせることで精製することが可能である。また、例えば、本発明のタンパク質をGSTやHis₆との融合タンパク質として発現させる場合には、それぞれグルタチオンセファロースカラム、ニッケルセファロースカラムを用いて精製することも可能である。

【0022】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0023】

【実施例】

【実施例1】 試料及び化学物質

脂質修飾及び非修飾のRab3Aは、Rab3A cDNAを持つバキュロウイルス (baculovirus) で感染させたSf (*Spodoptera frugiperda*) 9細胞の膜及び可溶性分画それぞれから精製した (Kikuchi, A., et al. (1995) *Methods Enzymol.* 257, 57-70)。Rab2、Rab3B、Rab3C、Rab3D、Rab5A、及びRab11の脂質修飾体を、各cDNAを持つバキュロウイルスで感染させたSf9細胞の膜分画から同様の方法で精製した。なお、[γ -³²P]GTP (185 TBq/mmol) 及び、[α -³²P]GTP (110 TBq/mmol) はアマーシャム社より購入した。

【0024】【実施例2】 Rab3 GAPの標準的測定

脂質修飾されたRab3A (3pmol) を、「25mM Tris/HCl (pH8.0)、10mM EDTA、5mM MgCl₂、0.5mM DTT、0.3% CHAPS、及び1.5 μ M [γ -³²P]GTP (1 \times 10⁴ cpm/pmol)」を含む反応混合液 (10 μ l) 中、30℃で10分間インキュベートした。この反応を2.5 μ lの80mM MgCl₂を加えて停止した。この混合液 (12.5 μ l) に、測定するサンプルを総量50 μ lになるように加え、さらに30℃で5分間インキュベートした。この混合液をニトロセルロースフィルターに流し、フィルター上の残留放射活性をチェレンコフカウンティング (Cerenkov counting) により決定した。

【0025】【実施例3】 「overlay法」によるRab3GAP活性の測定

Rab3GAPの精製したサンプルに対しポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った (図2A)。セミドライ (semi-dry) ウェスタンブロッティング後、ニトロセルロースフィルターに結合したタンパク質を、「1%ウシ血清アルブミン、0.5mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、及び5mM DTT」を含むリン酸緩衝生理食塩水中で処理し、変性を回復させた。Rab3GAP活性を検知するため、フィルターを「25mM HEPES/NaOH (pH7.0)、0.05% Triton X-100、1.25mM MgCl₂、及び2.5mM DTT」を含む緩衝液中で [γ -³²P]GTP-Rab3Aとともに25℃で10分間インキュベートした。フィルターを、「25mM HEPES/NaOH (pH7.0)、5m

MgCl₂、及び2.5mM DTT」を含むリン酸緩衝生理食塩水中で洗浄し、放射活性を「Fujix BAS 2000 Imaging Analyzer」で測定した。この結果、分子量約130kDaの位置にRab3GAPのバンドが検出された（図には示していない）。

【0026】【実施例4】 Rab3GAPの精製

すべての精製は0~4℃で行った。シナプス可溶性(SS)分画を200匹のラット脳から調製し(Mizoguchi, A., et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 11872-11879)、その5分の1のSS分画(450ml、315mg)を「緩衝液A」(20mM Tris/HCl (pH 7.5)、0.5mM EDTA、及び1mM DTT)で平衡したQ-セファロースFFカラム(2.6×23cm)を用いて分画した。600mlの「緩衝液A」でカラムを洗浄後、溶出を600mlの「緩衝液A」中のNaClの直線勾配(0-0.5M)、続いて120mlの「緩衝液A」中の0.5M NaClを用いて流出速度5ml/分で行い、8mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画62-70で検出された。次いで、これらの分画(72ml、36mg)を集め、一方、残りのSS分画について同様の方法で同じQ-セファロースFFカラムクロマトグラフィーを4回行った。5回のQ-セファロースFFカラムクロマトグラフィーのサンプルをプールし、「緩衝液B」(20mM リン酸カリウム(pH7.5)、及び1mM DTT)720mlで希釈した。そのサンプルを「緩衝液B」で平衡させたヒドロキシアパタイトカラム(2.6×6.6cm)を用いてさらに分画した。同じ緩衝液350mlでカラムを洗浄後、溶出を「緩衝液B」中の500mlのリン酸カリウムの直線勾配(20-212mM)、続いて「緩衝液B」中の150mlの直線勾配(212-500mM)及び150mlの500mM リン酸カリウムを用いて流出速度1.25ml/分で行い、10mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画29-40で検出された。次いで、この分画(120ml、18mg)を集め、240mlの「緩衝液A」で希釈した。そのサンプルを「緩衝液A」で平衡させたヘパリン-セファロースCL-6Bカラム(0.5×5cm)を用いてさらに分画した。同じ緩衝液20mlでカラムを洗浄後、溶出を「緩衝液A」中の0.5M NaClを用いて流出速度0.5ml/分で行い、1mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画2-6で見られた。これらの分画(5ml、4mg)を集め、その5分の1を2mlの「緩衝液A」で希釈して「緩衝液A」中で2mlの280mM NaClで平衡させたモノQ PC 1.6/5カラムを用いて分画した。2mlの同じ緩衝液でカラムを洗浄後、溶出を、「緩衝液A」中の3mlのNaClの直線勾配(280-500mM)、続いて0.5mlのNaClの直線勾配及び緩衝液A中の0.5mlの1M NaClを用いて流出速度0.1ml/分で行い、0.1mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画10及び11で検出された(図1参照)。これらの分画(0.2ml、14μg)を集め、一方、残りのヘパリン-セファロースのサンプルについては、同様の方法でモノQ カラムクロマトグラフィーを4回行った。5回のモノQ カラムクロマトグラフィーのサンプルをプールして、使用時まで-80℃

で保存した。

【0027】最後のモノQ カラムクロマトグラフィーにおいて、GAP活性は約150kDa及び約130kDaのMrを持つ2つのタンパク質の溶出パターンと一致した(図1A及びB)。このサンプルをスクロース密度勾配超遠心分離(ultracentrifugation)で分画し、さらにモノQ カラムクロマトグラフィーを行ったところ、GAP活性はこの2つのタンパク質の溶出パターンと一致した(図1C及びD)。スクロース密度勾配超遠心分離によって評価されたMrは約290kDaだった。これらの結果からRab3GAPは150kDa及び130kDaのタンパク質のヘテロダイマーであると推定される。

【0028】【実施例5】 薄層クロマトグラフィーによるRab3GAP活性の測定

[α -³²P]GTP-Rab3Aを、[γ -³²P]GTPの代わりに[α -³²P]GTP用いたことを除いて実施例2の方法と同様に調製し、ニトロセルロースフィルターに流した。フィルターを洗浄後、「20mM Tris/HCl (pH8.0)、20mM EDTA、2% SDS、1mM GDP、及び1mM GTP」を含む緩衝液に65℃で5分間、フィルターを浸すことによりRab3Aに結合したグアニンヌクレオチドを溶出した。放出されたヌクレオチドを、展開液としての1M リン酸カリウムを用いてポリエチレンジアミン-セルロース(マシェレー-ネーゲル(Mashey-Nagel)社製)クロマトグラフィーにより分離し、放射活性を、「Fujix BAS 2000 Imaging Analyzer」で測定した。

【0029】この結果、最初のモノQ カラムクロマトグラフィーからのRab3GAPサンプルに薄層クロマトグラフィーによって評価されたGAP活性が確かに示された(図2B)。脂質修飾Rab3Aにおいては活性を持つが、非修飾体では活性は持たなかった(図3A)。多くのRabファミリーにおいて、Rab3A、Rab3B、Rab3C、及びRab3Dを含むRab3サブファミリーにRab3GAPは活性を示し、Rab2、Rab5A、及びRab11を含む他のRabサブファミリーには活性を示さなかった(図3B)。Rab3サブファミリーにおいて、Rab3GAPはRab3A、Rab3C、及びRab3Dには強い活性を示したが、Rab3Bには弱い活性しか示さなかった。

【0030】【実施例6】 アミノ酸配列の測定

200匹のラット脳から一連のカラムクロマトグラフィーによって集めたRab3GAPのモノQサンプル(13μg)に対しSDS-PAGEを行った。Rab3GAPに対応するタンパク質(130kDaのタンパク質)バンドをゲルから切り取り、リシルエンドペプチダーゼ(lysyl endopeptidase)で切断した。切断されたペプチドは、C18逆相高圧液体カラムクロマトグラフィーにより分離した(Imazumi, K., et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1409-1416)。このペプチドのいくつかのアミノ酸配列をペプチドシーケンサー(Shimadzu PSQ-1-gas phase sequencer)で決定した。

【0031】この結果、30以上のペプチドピークが見られ、3つのアミノ酸配列が決定された。これらの配列

は、「PVPARRRRLLFDDTREAEK」(配列番号: 3)、「LTE PAPVPIHK」(配列番号: 4)、及び「DMAPLKPEGRLHQHG K」(配列番号: 5)であった。さらに、130kDaのタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定するためにモノQサンプルの一部をSDS-PAGEにかけ、次にPVDF膜に転写したタンパク質をクーマジーブリリアントブルー(Coomassie brilliant blue)で染色した。このタンパク質に対応するタンパク質バンドを膜から切り離してペプチドシーケンサーに直接かけた。この結果、130kDaのタンパク質のN末端アミノ酸の配列が決定され、「AADSEPESEV」(配列番号: 6)であると判明した。

【0032】[実施例7] Rab3GAPの核酸配列の分子クローニング及び決定

ヒト脳cDNAライブラリーのスクリーニングにおけるハイブリダイゼーションの方法は常法(Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)にて行った。 λ gt10ファージベクターで得られるcDNAクローンをpBluescriptプラスミドを用いて再びクローン化した。

【0033】本発明者らはヒト脳cDNAライブラリーからcDNAをクローン化し、一次構造を決定した。この結果、ヒトcDNAは分子量が110521で981のアミノ酸を持つタンパク質をコードしていることが判明した(図4)。決定した塩基配列を配列番号: 2に、アミノ酸配列を配列番号: 1に示す。6個のアミノ酸を除いてペプチドのすべてのアミノ酸配列は配列番号: 6の配列を含んでいた。このアミノ酸配列のわずかな違いは種(species)の違いのためであると考えられる。一方、コンピューターホモロジーサーチ(computer homology search)により、この配列がジーンバンクヌクレオチドシーケンスデータベース(GenBank Nucleotide Sequence Database)にある機能が未知であるアクセッション(accession)番号D31886の遺伝子と同一であることが判明した。Rab3GAPをコードするcDNAは既知のタンパク質とは有意な相関性は見出されなかった。

【0034】[実施例8] 組換えRab3GAPの発現
発現プラスミド「pRSET-Rab3GAP」及び「pGEX-2T-Rab3欠失変異体」の構築を以下の方法により行った。開始メチオニンコドンの上流及び終止コドンの下流にKpnI部位の領域を付加したRab3GAP cDNAを含む2946塩基対断片をPCR反応により合成した。この断片をKpnIで切断し、プラスミド「pRSET」(Invitrogen社製)のKpnI部位へ挿入した(得られたプラスミドを「pRSET-Rab3GAP」と命名した)。「pRSET-Rab3GAP」で大腸菌DE3を形質転換した。30℃で4時間、1mM イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを用いて発現を誘導後、細胞を50mMのリン

配 列

Met Ala Ala Asp Ser Glu Pro Glu Ser Glu Val Phe Glu Ile Thr Asp

1

5

10

15

酸ナトリウム(pH7.4)及び50mM NaClを含む緩衝液中に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎し、遠心分離した。この上清から、His6融合Rab3GAPをNi²⁺-NTA-アガロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。この融合タンパク質を「50mMリン酸ナトリウム(pH7.4)、50mM NaCl、及び0.5M イミダゾール」を含む緩衝液で溶出した。欠失変異cDNA(1-909塩基対、910-1800塩基対、及び1801-2946塩基対)をPCR反応により合成し、「pGEX-2T」(Pharmacia社製)に挿入した(得られたプラスミドを「pGEX-2T-Rab3GAP欠失変異体」と命名した)。「pGEX-2T-Rab3GAP欠失変異体」を大腸菌DH5 α へ形質転換した。30℃で30分、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドで発現を誘導した後、細胞を10%スクロースを含む「緩衝液A」中に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎し、遠心分離した。この上清から、GST融合Rab3GAP欠失変異体をグルタチオン結合セファロースビーズにより精製した。

【0035】これにより130kDaの組み換えタンパク質がHis6融合タンパク質として調製された。この組換えタンパク質はRab3Aに対しGAP活性を確かに示した(図3C)。また他のRab3サブファミリーにも活性を示したが、他のRabファミリーには活性を示さなかった。配列番号: 1の1~303番目のアミノ酸、304~600番目のアミノ酸、及び601~981アミノ酸残基の組換えタンパク質を用いた触媒ドメイン解析により、少なくとも601~981番目のアミノ酸残基に触媒ドメイン存在することが示された。なお、ノーザンブロット解析により、脳、心臓、骨格筋、腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、精巣、及び卵巣を含むすべてのラットの組織において130kDaのタンパク質のmRNAが発現することが判明した。

【0036】

【発明の効果】本発明により、Rab3サブファミリーメンバーに特異的に作用するタンパク質が提供された。本発明のタンパク質は、特に神経伝達物質の放出に関与していると考えられるRab3サブファミリーメンバーの脂質結合形態に高い特異性を示し、このメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を示した。本発明の制御因子は、例えば、神経伝達物質の放出やホルモン分泌の制御機構や疾患との関連の解明への利用が期待される。

【0037】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 981

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

11	12
Phe Thr Thr Ala Ser Glu Trp Glu Arg Phe Ile Ser Lys Val Glu Glu	
20	25 30
Val Leu Asn Asp Trp Lys Leu Ile Gly Asn Ser Leu Gly Lys Pro Leu	
35	40 45
Glu Lys Gly Ile Phe Thr Ser Gly Thr Trp Glu Glu Lys Ser Asp Glu	
50	55 60
Ile Ser Phe Ala Asp Phe Lys Phe Ser Val Thr His His Tyr Leu Val	
65	70 75 80
Gln Glu Ser Thr Asp Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Leu Glu Asp Val	
85	90 95
Val Pro Gln Ser Met Gln Asp Leu Leu Gly Met Asn Asn Asp Phe Pro	
100	105 110
Pro Arg Ala His Cys Leu Val Arg Trp Tyr Gly Leu Arg Glu Phe Val	
115	120 125
Val Ile Ala Pro Ala Ala His Ser Asp Ala Val Leu Ser Glu Ser Lys	
130	135 140
Cys Asn Leu Leu Leu Ser Ser Val Ser Ile Ala Leu Gly Asn Thr Gly	
145	150 155 160
Cys Gln Val Pro Leu Phe Val Gln Ile His His Lys Trp Arg Arg Met	
165	170 175
Tyr Val Gly Glu Cys Gln Gly Pro Gly Val Arg Thr Asp Phe Glu Met	
180	185 190
Val His Leu Arg Lys Val Pro Asn Gln Tyr Thr His Leu Ser Gly Leu	
195	200 205
Leu Asp Ile Phe Lys Ser Lys Ile Gly Cys Pro Leu Thr Pro Leu Pro	
210	215 220
Pro Val Ser Ile Ala Ile Arg Phe Thr Tyr Val Leu Gln Asp Trp Gln	
225	230 235 240
Gln Tyr Phe Trp Pro Gln Gln Pro Pro Asp Ile Asp Ala Leu Val Gly	
245	250 255
Gly Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Gly Lys Leu Pro Phe Gly Ala Cys	
260	265 270
Glu Asp Pro Ile Ser Glu Leu His Leu Ala Thr Thr Trp Pro His Leu	
275	280 285
Thr Glu Gly Ile Ile Val Asp Asn Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asp Pro	
290	295 300
Ile Gln Ala Pro His Trp Ser Val Arg Val Arg Lys Ala Glu Asn Pro	
305	310 315 320
Gln Cys Leu Leu Gly Asp Phe Val Thr Glu Phe Phe Lys Ile Cys Arg	
325	330 335
Arg Lys Glu Ser Thr Asp Glu Ile Leu Gly Arg Ser Ala Phe Glu Glu	
340	345 350
Glu Gly Lys Glu Thr Ala Asp Ile Thr His Ala Leu Ser Lys Leu Thr	
355	360 365
Glu Pro Ala Ser Val Pro Ile His Lys Leu Ser Val Ser Asn Met Val	
370	375 380
His Thr Ala Lys Lys Lys Ile Arg Lys His Arg Gly Val Glu Glu Ser	
385	390 395 400
Pro Leu Asn Asn Asp Val Leu Asn Thr Ile Leu Leu Phe Leu Phe Pro	
405	410 415

13

14

Asp	Ala	Val	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Thr	Thr	Ser	Thr	Asp	Asn
Asn	Asn	Pro	Pro	Ser	Glu	Ser	Glu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Gln	Phe
Lys	Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Tyr	Lys	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu
Cys	Met	Ile	Asn	Phe	Tyr	His	Gly	Gly	Leu	Lys	Gly	Val	Ala	His	Leu
Trp	Gln	Glu	Phe	Val	Leu	Glu	Met	Arg	Phe	Arg	Trp	Glu	Asn	Asn	Phe
Leu	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Cys	Cys	Leu
Leu	His	Gln	Lys	Leu	Gln	Met	Leu	Asn	Cys	Cys	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys
Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Lys	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Thr	Asn	Ile
Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Gly	Lys	Ala	Gly	Asp	Gln	Leu	Val	Pro	Asp	Asn
Leu	Lys	Glu	Thr	Asp	Lys	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Ser	Trp	Asp
Ser	Trp	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Phe	Phe	Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Thr
Glu	Glu	Leu	Lys	Gly	Asn	Gly	Gln	Glu	Ser	Gly	Lys	Lys	Gly	Gly	Pro
Lys	Glu	Met	Ala	Asn	Leu	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg	Leu	Tyr	Gln	His	Gly
Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	His	Asn	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Ile	Pro	Val	Thr
Gln	Glu	Pro	Ala	Pro	Met	Thr	Glu	Asp	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Ser	Glu
Val	Leu	Ala	Lys	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Glu	Gly	Ala	His	Leu	Arg	Ala
Arg	Met	Gln	Ser	Ala	Cys	Leu	Leu	Ser	Asp	Met	Glu	Ser	Phe	Lys	Ala
Ala	Asn	Pro	Gly	Cys	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Val	Arg	Trp	Tyr	Ser	Pro
Arg	Asp	Tyr	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	Val	Val
Leu	Lys	Gly	Glu	Leu	Ser	Ala	Arg	Met	Lys	Ile	Pro	Ser	Asn	Met	Trp
Val	Glu	Ala	Trp	Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Ile	Pro	Ala	Arg	Arg	Gln	Arg
Arg	Leu	Phe	Asp	Asp	Thr	Arg	Glu	Ala	Glu	Lys	Val	Leu	His	Tyr	Leu
Ala	Ile	Gln	Lys	Pro	Ala	Asp	Leu	Ala	Arg	His	Leu	Leu	Pro	Cys	Val
Ile	His	Ala	Ala	Val	Leu	Lys	Val	Lys	Glu	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Asn
Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Ile	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Ser	His	Ser	Ser

15
 Lys Val Leu His Phe Pro Asn Pro Glu Asp Lys Lys Leu Glu Glu Ile
 820 825 830
 Ile His Gln Ile Thr Asn Val Glu Ala Leu Ile Ala Arg Ala Arg Ser
 835 840 845
 Leu Lys Ala Lys Phe Gly Thr Glu Lys Cys Glu Gln Glu Glu Lys
 850 855 860
 Glu Asp Leu Glu Arg Phe Val Ser Cys Leu Leu Glu Gln Pro Glu Val
 865 870 875 880
 Leu Val Thr Gly Ala Gly Arg Gly His Ala Gly Arg Ile Ile His Lys
 885 890 895
 Leu Phe Val Asn Ala Gln Arg Ala Ala Ala Met Thr Pro Pro Glu Glu
 900 905 910
 Glu Leu Lys Arg Met Gly Ser Pro Glu Glu Arg Arg Gln Asn Ser Val
 915 920 925
 Ser Asp Phe Pro Pro Pro Ala Gly Arg Glu Phe Ile Leu Arg Thr Thr
 930 935 940
 Val Pro Arg Pro Ala Pro Tyr Ser Lys Ala Leu Pro Gln Arg Met Tyr
 945 950 955 960
 Ser Val Leu Thr Lys Glu Asp Phe Arg Leu Ala Gly Ala Phe Ser Ser
 965 970 975
 Asp Thr Ser Phe Phe
 980

配列番号 : 2

配列の長さ : 2946

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 2943

特徴を決定した方法 : E

配 列

ATG GCT GCC GAC AGT GAG CCC GAA TCC GAG GTA TTT GAG ATC ACG GAC 48
 Met Ala Ala Asp Ser Glu Pro Glu Ser Glu Val Phe Glu Ile Thr Asp
 1 5 10 15
 TTC ACC ACT GCC TCG GAA TGG GAA AGG TTT ATT TCC AAA GTT GAA GAA 96
 Phe Thr Thr Ala Ser Glu Trp Glu Arg Phe Ile Ser Lys Val Glu Glu
 20 25 30
 GTC TTG AAT GAC TGG AAA CTG ATT GGA AAC TCT TTG GGA AAG CCA CTC 144
 Val Leu Asn Asp Trp Lys Leu Ile Gly Asn Ser Leu Gly Lys Pro Leu
 35 40 45
 GAA AAG GGT ATA TTT ACT TCT GGC ACA TGG GAA GAG AAA TCA GAT GAA 192
 Glu Lys Gly Ile Phe Thr Ser Gly Thr Trp Glu Glu Lys Ser Asp Glu
 50 55 60
 ATT TCC TTT GCT GAC TTC AAG TTC TCA GTC ACT CAT CAT TAT CTT GTA 240
 Ile Ser Phe Ala Asp Phe Lys Phe Ser Val Thr His His Tyr Leu Val
 65 70 75 80
 CAA GAG TCC ACT GAT AAA GAA GGA AAG GAT GAG TTA TTA GAG GAT GTT 288
 Gln Glu Ser Thr Asp Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Leu Glu Asp Val
 85 90 95
 GTT CCA CAA TCT ATG CAA GAT TTG CTG GGT ATG AAT AAT GAC TTT CCT 336
 Val Pro Gln Ser Met Gln Asp Leu Leu Gly Met Asn Asn Asp Phe Pro
 100 105 110
 CCA AGA GCA CAT TGC CTG GTA AGA TGG TAT GGG CTA CGT GAG TTC GTG 384

17	18
Pro Arg Ala His Cys Leu Val Arg Trp Tyr Gly Leu Arg Glu Phe Val	
115 120 125	
GTG ATT GCC CCT GCT GCA CAC AGT GAC GCT GTT CTC AGC GAA TCT AAG	432
Val Ile Ala Pro Ala Ala His Ser Asp Ala Val Leu Ser Glu Ser Lys	
130 135 140	
TGC AAC CTT CTT CTG AGT TCT GTT TCT ATT GCC TTG GGA AAC ACT GGC	480
Cys Asn Leu Leu Leu Ser Ser Val Ser Ile Ala Leu Gly Asn Thr Gly	
145 150 155 160	
TGT CAG GTG CCA CTC TTT GTG CAA ATT CAC CAC AAA TGG CGA AGA ATG	528
Cys Gln Val Pro Leu Phe Val Gln Ile His His Lys Trp Arg Arg Met	
165 170 175	
TAT GTA GGA GAA TGT CAA GGT CCT GGT GTA CGA ACT GAT TTC GAA ATG	576
Tyr Val Gly Glu Cys Gln Gly Pro Gly Val Arg Thr Asp Phe Glu Met	
180 185 190	
GTT CAT CTT AGA AAA GTG CCA AAT CAG TAC ACT CAC TTA TCA GGT CTG	624
Val His Leu Arg Lys Val Pro Asn Gln Tyr Thr His Leu Ser Gly Leu	
195 200 205	
CTG GAT ATC TTC AAA TCA AAG ATT GGA TGT CCT TTA ACT CCA TTG CCT	672
Leu Asp Ile Phe Lys Ser Lys Ile Gly Cys Pro Leu Thr Pro Leu Pro	
210 215 220	
CCA GTT AGT ATT GCT ATT CGA TTT ACC TAT GTA CTT CAA GAT TGG CAG	720
Pro Val Ser Ile Ala Ile Arg Phe Thr Tyr Val Leu Gln Asp Trp Gln	
225 230 235 240	
CAG TAT TTT TGG CCT CAG CAA CCT CCA GAC ATA GAT GCC CTT GTA GGA	768
Gln Tyr Phe Trp Pro Gln Gln Pro Pro Asp Ile Asp Ala Leu Val Gly	
245 250 255	
GGA GAA GTT GGA GGC TTG GAG TTT GGC AAG TTA CCA TTT GGT GCC TGC	816
Gly Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Gly Lys Leu Pro Phe Gly Ala Cys	
260 265 270	
GAA GAT CCT ATT AGT GAA CTC CAT TTA GCT ACT ACA TGG CCT CAT CTG	864
Glu Asp Pro Ile Ser Glu Leu His Leu Ala Thr Thr Trp Pro His Leu	
275 280 285	
ACC GAA GGG ATC ATT GTG GAT AAT GAT GTT TAT TCT GAT TTG GAT CCT	912
Thr Glu Gly Ile Ile Val Asp Asn Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asp Pro	
290 295 300	
ATT CAA GCT CCA CAT TGG TCT GTT AGA GTT CGA AAA GCT GAG AAT CCT	960
Ile Gln Ala Pro His Trp Ser Val Arg Val Arg Lys Ala Glu Asn Pro	
305 310 315 320	
CAG TGT TTG CTA GGT GAT TTT GTC ACT GAA TTT TTT AAA ATT TGC CGT	1008
Gln Cys Leu Leu Gly Asp Phe Val Thr Glu Phe Phe Lys Ile Cys Arg	
325 330 335	
CGA AAG GAG TCA ACT GAT GAG ATT CTT GGA CGA TCT GCA TTT GAG GAA	1056
Arg Lys Glu Ser Thr Asp Glu Ile Leu Gly Arg Ser Ala Phe Glu Glu	
340 345 350	
GAA GGC AAA GAA ACT GCT GAT ATA ACT CAT GCT TTG TCA AAA TTG ACA	1104
Glu Gly Lys Glu Thr Ala Asp Ile Thr His Ala Leu Ser Lys Leu Thr	
355 360 365	
GAG CCG GCA TCA GTT CCA ATT CAT AAA TTA TCA GTT TCA AAT ATG GTA	1152
Glu Pro Ala Ser Val Pro Ile His Lys Leu Ser Val Ser Asn Met Val	
370 375 380	

19	20
CAC ACT GCA AAG AAG AAA ATC CGA AAA CAC AGA GGT GTA GAG GAG TCA His Thr Ala Lys Lys Lys Ile Arg Lys His Arg Gly Val Glu Glu Ser 385 390 395 400	1200
CCG CTA AAT AAT GAT GTT CTT AAT ACT ATT CTC CTG TTC TTA TTC CCT Pro Leu Asn Asn Asp Val Leu Asn Thr Ile Leu Leu Phe Leu Phe Pro 405 410 415	1248
GAT GCT GTT TCT GAG AAA CCA TTA GAT GGA ACT ACT TCA ACA GAT AAT Asp Ala Val Ser Glu Lys Pro Leu Asp Gly Thr Thr Ser Thr Asp Asn 420 425 430	1296
AAT AAT CCT CCA TCA GAG AGT GAA GAC TAT AAT CTC TAC AAT CAG TTC Asn Asn Pro Pro Ser Glu Ser Glu Asp Tyr Asn Leu Tyr Asn Gln Phe 435 440 445	1344
AAG TCT GCA CCA TCT GAC AGT TTA ACA TAC AAA CTG GCT TTG TGT CTC Lys Ser Ala Pro Ser Asp Ser Leu Thr Tyr Lys Leu Ala Leu Cys Leu 450 455 460	1392
TGT ATG ATC AAT TTT TAC CAT GGA GGG TTG AAA GGA GTG GCA CAC CTC Cys Met Ile Asn Phe Tyr His Gly Gly Leu Lys Gly Val Ala His Leu 465 470 475 480	1440
TGG CAG GAA TTT GTT CTT GAA ATG CGT TTC CGA TGG GAA AAC AAC TTT Trp Gln Glu Phe Val Leu Glu Met Arg Phe Arg Trp Glu Asn Asn Phe 485 490 495	1488
CTG ATT CCA GGA TTA GCA AGT GGA CCC CCA GAT CTG AGG TGT TGT TTA Leu Ile Pro Gly Leu Ala Ser Gly Pro Pro Asp Leu Arg Cys Cys Leu 500 505 510	1536
CTG CAT CAG AAA CTA CAG ATG TTA AAT TGT TGT ATT GAA AGA AAG AAG Leu His Gln Lys Leu Gln Met Leu Asn Cys Cys Ile Glu Arg Lys Lys 515 520 525	1584
GCA CGT GAT GAG GGG AAA AAG ACA AGT GCT TCA GAT GTC ACT AAT ATA Ala Arg Asp Glu Gly Lys Lys Thr Ser Ala Ser Asp Val Thr Asn Ile 530 535 540	1632
TAT CCA GGG GAT GCT GGA AAA GCA GGA GAC CAG TTG GTG CCA GAT AAT Tyr Pro Gly Asp Ala Gly Lys Ala Gly Asp Gln Leu Val Pro Asp Asn 545 550 555 560	1680
CTA AAA GAA ACA GAT AAG GAA AAG GGA GAG GTA GGA AAA TCT TGG GAT Leu Lys Glu Thr Asp Lys Glu Lys Gly Glu Val Gly Lys Ser Trp Asp 565 570 575	1728
TCC TGG AGT GAC AGC GAA GAA GAA TTT TTT GAA TGC CTA AGT GAT ACT Ser Trp Ser Asp Ser Glu Glu Glu Phe Phe Glu Cys Leu Ser Asp Thr 580 585 590	1776
GAA GAA CTT AAA GGA AAT GGA CAA GAG AGT GGC AAG AAA GGA GGA CCT Glu Glu Leu Lys Gly Asn Gly Gln Glu Ser Gly Lys Lys Gly Gly Pro 595 600 605	1824
AAG GAG ATG GCA AAT TTA AGG CCG GAA GGA CGG CTC TAT CAG CAT GGG Lys Glu Met Ala Asn Leu Arg Pro Glu Gly Arg Leu Tyr Gln His Gly 610 615 620	1872
AAA CTT ACA CTG CTG CAT AAT GGA GAA CCT CTC TAC ATT CCA GTA ACC Lys Leu Thr Leu Leu His Asn Gly Glu Pro Leu Tyr Ile Pro Val Thr 625 630 635 640	1920
CAG GAA CCA GCA CCT ATG ACA GAA GAT CTG CTA GAA GAG CAG TCT GAA Gln Glu Pro Ala Pro Met Thr Glu Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ser Glu	1968

21	645	650	655	22
GTT TTA GCT AAA TTA GGT ACA TCG GCA GAG GGG GCT CAC CTT CGA GCA				2016
Val Leu Ala Lys Leu Gly Thr Ser Ala Glu Gly Ala His Leu Arg Ala				
660	665	670		
CGC ATG CAG AGT GCC TGT CTG CTC TCA GAT ATG GAG TCT TTT AAG GCA				2064
Arg Met Gln Ser Ala Cys Leu Leu Ser Asp Met Glu Ser Phe Lys Ala				
675	680	685		
GCT AAT CCA GGT TGC TCC CTG GAA GAT TTT GTG AGG TGG TAT TCA CCC				2112
Ala Asn Pro Gly Cys Ser Leu Glu Asp Phe Val Arg Trp Tyr Ser Pro				
690	695	700		
CGG GAT TAT ATT GAA GAG GAG GTG ATT GAT GAA AAG GGC AAT GTG GTG				2160
Arg Asp Tyr Ile Glu Glu Glu Val Ile Asp Glu Lys Gly Asn Val Val				
705	710	715	720	
CTG AAA GGA GAA CTG AGT GCC CGG ATG AAG ATT CCA AGC AAT ATG TGG				2208
Leu Lys Gly Glu Leu Ser Ala Arg Met Lys Ile Pro Ser Asn Met Trp				
725	730	735		
GTA GAA GCC TGG GAA ACA GCT AAG CCA ATT CCT GCT AGA AGG CAA AGG				2256
Val Glu Ala Trp Glu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Ala Arg Arg Gln Arg				
740	745	750		
AGA CTC TTT GAT GAT ACA CGG GAA GCA GAA AAG GTG CTG CAC TAT CTG				2304
Arg Leu Phe Asp Asp Thr Arg Glu Ala Glu Lys Val Leu His Tyr Leu				
755	760	765		
GCA ATC CAG AAA CCT GCA GAC CTT GCT CGG CAC CTG TTA CCT TGT GTG				2352
Ala Ile Gln Lys Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Leu Leu Pro Cys Val				
770	775	780		
ATT CAT GCA GCT GTA CTC AAG GTA AAG GAA GAA GAA AGT CTC GAA AAC				2400
Ile His Ala Ala Val Leu Lys Val Lys Glu Glu Glu Ser Leu Glu Asn				
785	790	795	800	
ATT TCT TCA GTT AAG AAG ATC ATA AAG CAG ATA ATA TCC CAT TCC AGT				2448
Ile Ser Ser Val Lys Lys Ile Ile Lys Gln Ile Ile Ser His Ser Ser				
805	810	815		
AAA GTT TTG CAC TTC CCC AAT CCA GAA GAC AAG AAA TTG GAA GAA ATC				2496
Lys Val Leu His Phe Pro Asn Pro Glu Asp Lys Lys Leu Glu Glu Ile				
820	825	830		
ATT CAC CAG ATT ACT AAT GTG GAA GCT CTC ATT GCC AGA GCT CGG TCA				2544
Ile His Gln Ile Thr Asn Val Glu Ala Leu Ile Ala Arg Ala Arg Ser				
835	840	845		
CTA AAA GCC AAG TTT GGA ACT GAG AAA TGT GAA CAG GAG GAG GAA AAG				2592
Leu Lys Ala Lys Phe Gly Thr Glu Lys Cys Glu Gln Glu Glu Glu Lys				
850	855	860		
GAA GAT CTT GAA AGG TTT GTG AGT TGC CTG CTG GAG CAG CCT GAA GTG				2640
Glu Asp Leu Glu Arg Phe Val Ser Cys Leu Leu Glu Gln Pro Glu Val				
865	870	875	880	
TTA GTC ACC GGT GCA GGA AGA GGA CAT GCT GGC AGG ATC ATT CAC AAG				2688
Leu Val Thr Gly Ala Gly Arg Gly His Ala Gly Arg Ile Ile His Lys				
885	890	895		
CTG TTT GTG AAT GCC CAG AGG GCT GCA GCT ATG ACT CCA CCA GAG GAG				2736
Leu Phe Val Asn Ala Gln Arg Ala Ala Ala Met Thr Pro Pro Glu Glu				
900	905	910		
GAA TTG AAG AGA ATG GGC TCC CCA GAG GAA AGA AGG CAG AAC TCC GTG				2784

23 24

Glu Leu Lys Arg Met Gly Ser Pro Glu Glu Arg Arg Gln Asn Ser Val

915 920 925

TCA GAC TTC CCA CCC CCT GCT GGC CGG GAA TTC ATT TTG CGC ACC ACT 2832

Ser Asp Phe Pro Pro Pro Ala Gly Arg Glu Phe Ile Leu Arg Thr Thr

930 935 940

GTG CCG CGC CCT GCT CCC TAC TCC AAA GCT CTG CCT CAG CGG ATG TAC 2880

Val Pro Arg Pro Ala Pro Tyr Ser Lys Ala Leu Pro Gln Arg Met Tyr

945 950 955 960

AGT GTT CTC ACC AAA GAG GAC TTT AGA CTT GCA GGT GCC TTT TCA TCA 2928

Ser Val Leu Thr Lys Glu Asp Phe Arg Leu Ala Gly Ala Phe Ser Ser

965 970 975

GAT ACT TCC TTC TTC TGA 2946

Asp Thr Ser Phe Phe

980

配列番号：3

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Pro Val Pro Ala Arg Arg Gln Arg Arg Leu Phe Asp Asp Thr Arg Glu Ala Glu

1 5 10 15

Lys

配列番号：4

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Thr Glu Pro Ala Pro Val Pro Ile His Lys

*

配列

Asp Met Ala Pro Leu Lys Pro Glu Gly Arg Leu His Gln His Gly Lys

1 5 10 15

配列番号：6

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Ala Asp Ser Glu Pro Glu Ser Glu Val

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 AはモノQカラムクロマトグラフィーでのRab3GAP活性の溶出のプロフィールを示す図である。基質として[γ - 32 P]GTP-Rab3Aを用いて各分画の一部(0.25 μ l)のRab3GAP活性を測定した。(●)はフィルター上の残留放射活性を、(---)は280nmの吸光度を、(—)はNaCl濃度をそれぞれ示す。BはモノQカラムクロマトグラフィーのタンパク質染色像である。各分画の一部(5 μ l)をSDS-PAGE(8%ポリアクリルアミドゲル)にかけ、続いてタンパク質を銀染色した。Cはスクロース密度勾配超遠心でのRab3GAP活性の溶出プロフィール及びタンパク質染色像を

※1

5

10

配列番号：5

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

40

示す。モノQPC1.6/5分画のサンプルを「緩衝液A」を含む4.8ml直線スクロース勾配(5-40%)に重層し、219,000gで13.8時間遠心した。160 μ lずつの分画を集めた。各分画の一部(20 μ l)をSDS-PAGEにかけ、続いてタンパク質を銀染色した。(●)はフィルター上の残留放射活性を示し、挿入図はタンパク質染色像を示す。Dは再び行ったモノQカラムクロマトグラフィーでのRab3GAP活性の溶出プロフィール及びタンパク質染色像を示す。スクロース密度勾配超遠心のサンプル(450 μ l)を集め、1.2% CHAPS及び1350 μ lの「緩衝液C」(0.6%CHAPSを含む緩衝液A)を含む緩衝液A450 μ lで希釈した。サンプルを「緩衝液C」とともにモノQ PC1.6/5カラムクロマトグラフィーにて分画した。カラムを2mlの280mM NaClを含む「緩衝液C」で洗浄後、3mlのNaCl直線勾配(280-500mM)を用いて溶出を行い、続いて0.5mlのNaCl直線勾配(0.5-1M)、及び「緩衝液C」中の1M NaClを流出速度0.1ml/分で行い、100 μ lずつの分画を集めた。各分画の一部(60 μ l)をSDS-PAGEにかけ、続いて銀染色した。()はフィルター上の残留放射活性を示し、挿入図はタンパク質染色像を

示す。

【図2】AはOverlay法にてRab3GAP活性を検出するために用いたモノQサンプルの電気泳動像である。Bは薄層クロマトグラフィーにてRab3GAP活性を検出した結果を示す図である。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP-Rab3A}$ をRab3GAPのモノQサンプル(50ng)の存在下または非存在下で、30℃で5分間インキュベートし、続いてフィルターに通した。Rab3Aに結合したグアニンヌクレオチドをフィルターから溶出し、溶出されたヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーにより分離した。

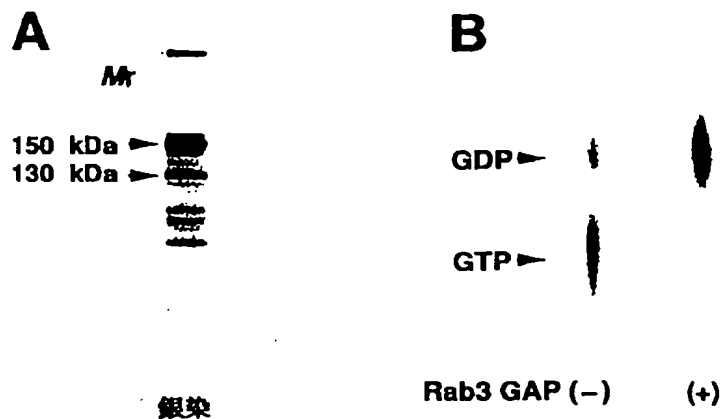
【図3】Aは、Rab3GAPに対する基質の脂質修飾の必要性について検討した結果を示す図である。脂質修飾及び脂質非修飾のRab3Aに結合した $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の加水分解を様々な量のRab3GAPのモノQサンプルの存在下で測定した。(●)は脂質修飾したRab3Aを示し、(○)は脂質非修飾のRab3Aを示す。Bは、Rab3Aの基質特異性を検討した結果を

示す図である。Rabファミリーの脂質修飾体に結合した $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の加水分解をさまざまな量のモノQサンプルの存在下で測定した。(●)はRab3Aを、(▲)はRab3Bを、(■)はRab3Cを、(◆)はRab3Dを、(◇)はRab2を、(□)はRab5Aを、(○)はRab11をそれぞれ示す。Cは組換えRab3GAPのGAP活性を検出した結果を示す図である。脂質修飾されたRab3Aに結合した $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ をモノQサンプルまたはRab3GAPの組換えサンプルの存在下で測定した。(●)はHis6-GAP、(○)はRab3GAPのモノQサンプルを示す。

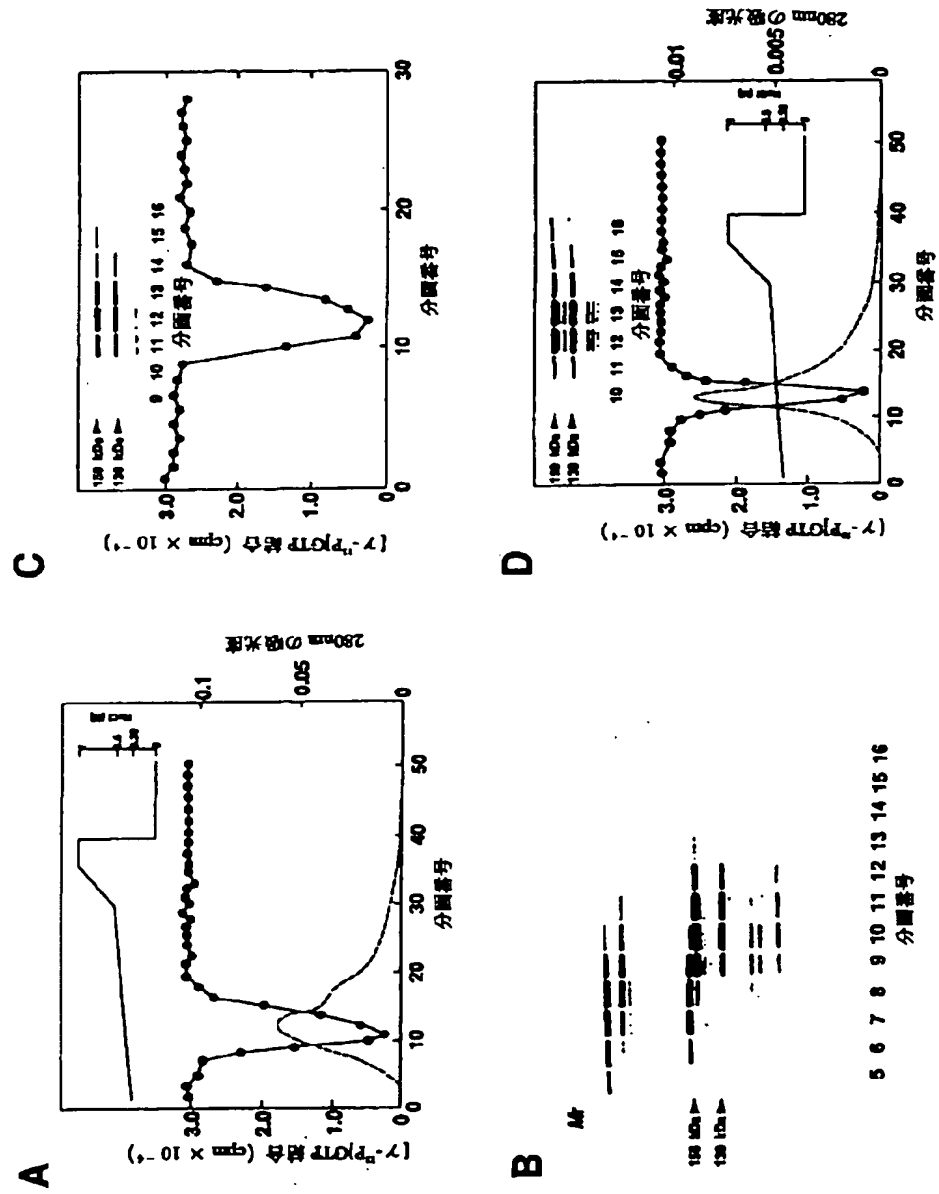
10

【図4】Rab3GAPの推定されたアミノ酸配列を示す図である。Rab3GAPのモノQサンプルから決定されたアミノ酸配列を下線部に示した。なお、アミノ酸の表記は生化学事典第2版(東京化学同人)p1468記載の一字表記に従った。

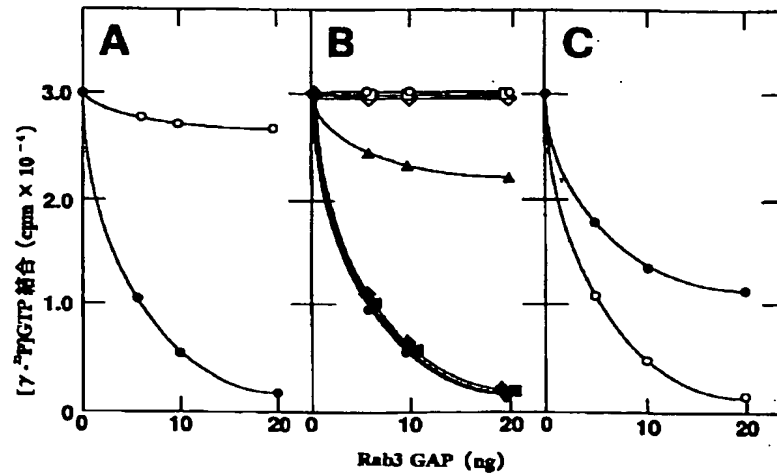
【図2】



【図1】



【図 3】



【図 4】

MAADSEPESEVFEITDFTTASEWERFISKVEEVLNDWKLGNSLKGPLEK
 GIFTSGTWEEKSDEISFADFKFSVTH#HYLVQESTDKEGKDELLEDVVPQS
 MQDLLGMNDFPPRAHCLVRWYGLREFVVIAPAAHSDAVLSESKMILL
 SSVSIALGNTGCQVPLFVQJH#KWRMYVGECCQGPVRTDFEMVHLRKV
 PNQYTHLSGLDIFKSKIGCPLTLPVPSIARFTYVLQDWQQYFWPQQPP
 DIDALVGGEGVGLFQKLPFGACEDPISELHLATTWPHLTEGIVDNDVYS
 DLDPQAPHWSVRVRKAENPQCLLGOFVTEFFKIORRESTDDEILGRSAFE
 EEGKETADITHALSKLTEPASVPIHKLVSNNMVHTAKKKIRKHRGVEESP
 LNNDVLNTILLFLFPDAVSEKPLDGTSTDNNNPPSESEDYNLYNQFSAP
 SDSLTYYKALCLCMINFYHGGKGVVAHLWQEFVLEMRFRWENNFIJPLA
 SGPPDLRCCLLHQKLQMLNCCIERKKARDEGKKTASADVNTIYPGDAKKA
 GQQLVPDNLKETDKEKGEVGKSWDSWSDSEEEFECLSDTEELKGNGQES
 GKKGPKEMANLRPEGRLYQHKGKLTLLHNGEPLYIPVTQEPAPMTEDLLEE
 QSEVLAKLGTSAEGAHLRARMQSAQLLSDMESFKAANPGCSLEDFVRWY
 SPRDYIEEEVIDEKGNNVVLKGLSARMKIPSNMWVEAWETAKPIPARQR
 RLDDOTREAEKVLYHLYAQKPADLARHLLPCVHAAYLVKVEEESLENISS
 VKKIKQSHSSKVLHFPNPEDKKLEIIHQITNVEALJARARSLKAKFGT
 EKCEQEEEEKDLERFVSCLEQPEVLVTGAGRGHAGRIHKLFFVNAQRAA
 AMTPPEELKRMGSPERRONSVDPPPAGREFILRTTVPRPAPYSKAL
 PQRMYSVLTKEDFRLAGAFSSOTSFF

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F 1

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/14

C 1 2 R 1:19)